



## FD-891, FD-892, これらの誘導体群の系統的合成と構造活性相関研究および新規P450 基質スクリーニング法を用いたP450BM3 変異体の基質特異性解析

著者	川又 綾乃
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17510号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00121256">http://hdl.handle.net/10097/00121256</a>

# FD-891, FD-892, これらの誘導体群の系統的合成と構造活性相関研究 および新規 P450 基質スクリーニング法を用いた P450BM3 変異体の基質特異性 解析

合成制御化学分野 川又綾乃

著者は博士論文研究においてまず、合成化学的手法を用いて抗腫瘍活性天然物 FD-891 (1), FD-892 (2) およびこれら誘導体群の系統的合成と構造活性相関研究を行った。次に、ケミカルバイオロジー的手法を用いて P450 基質スクリーニング法を確立し、それを用いて P450BM3 変異体の基質特異性解析を行った。以下にその概要を示す。

## 1. FD-891, FD-892, これらの誘導体群の系統的合成と構造活性相関研究

FD-891 (1), FD-892 (2) は *Streptomyces graminofaciens* A-8890 より単離された 16 員環マクロライドであり (Figure 1)、様々な腫瘍細胞に対し細胞毒性を有する。FD-891 (1) は既存の抗ガン剤とは異なる活性発現メカニズムを有することとが示唆されており、FD-891 (1) の抗腫瘍活性発現機構の解明には興味をもたれる。一方、FD-891 (1) の生合成では、FD-892 (2) に対して、多機能型シトクロム P450GfsF による C8-9 位のエポキシ化と C10 位への水酸基導入が段階的かつ高立体選択的に行われている。通常有機合成試薬では困難なこの変換が、GfsF によってどのような分子認識のもとで達成されているのか興味を持たれた。著者は FD-891 の生物活性発現機構と、FD-892 (2) から FD-891 (1) に至る生合成機構を解析すべく、その基盤となる構造活性相関情報を得るために FD-891 (1), FD-892 (2) およびこれら誘導体の系統的合成を行った<sup>[1,2]</sup>。

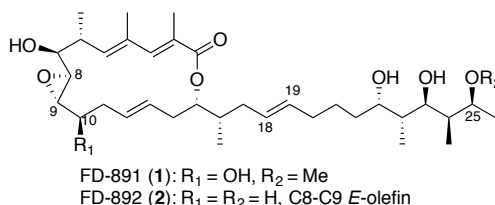
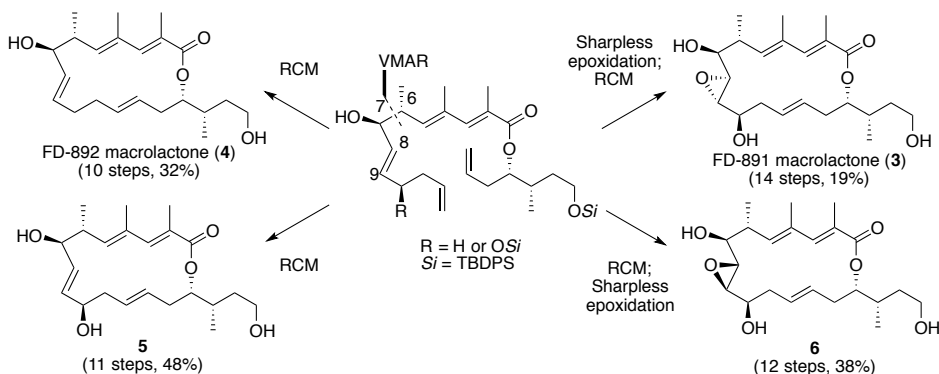


Figure 1

まず FD-891 (1), FD-892 (2) のマクロラクトン部 3, 4 およびその誘導体 5, 6 を vinylogous Mukaiyama aldol reaction (VMAR) と ring closing metathesis (RCM) および Sharpless 不斉エポキシ化反応を鍵として合成した (Scheme 1)。



Scheme 1

これらの抗腫瘍活性および **4**, **5** の GfsF による酸化反応を検討した結果、予想に反して、マクロラクトン部のみでは抗腫瘍活性の発現も GfsF による基質認識も行われず、側鎖部が極めて重要であることが明らかになった。そこで鎖長を変えた各種側鎖部を合成し、抗腫瘍活性および GfsF による認識への影響を調べることにした。FD-891 (**1**), FD-892 (**2**) の側鎖部 **7a**, **7b** および短鎖誘導体は Brown 不斉クロチルホウ素化反応、Evans アルドール反応を鍵として合成した。これらを各マクロラクトン部と Julia カップリングにより連結し、FD-891 (**1**), FD-892 (**2**) および誘導体群の合成を達成した (Scheme 3)。実際に合成した誘導体は Figure 2 の通りである。

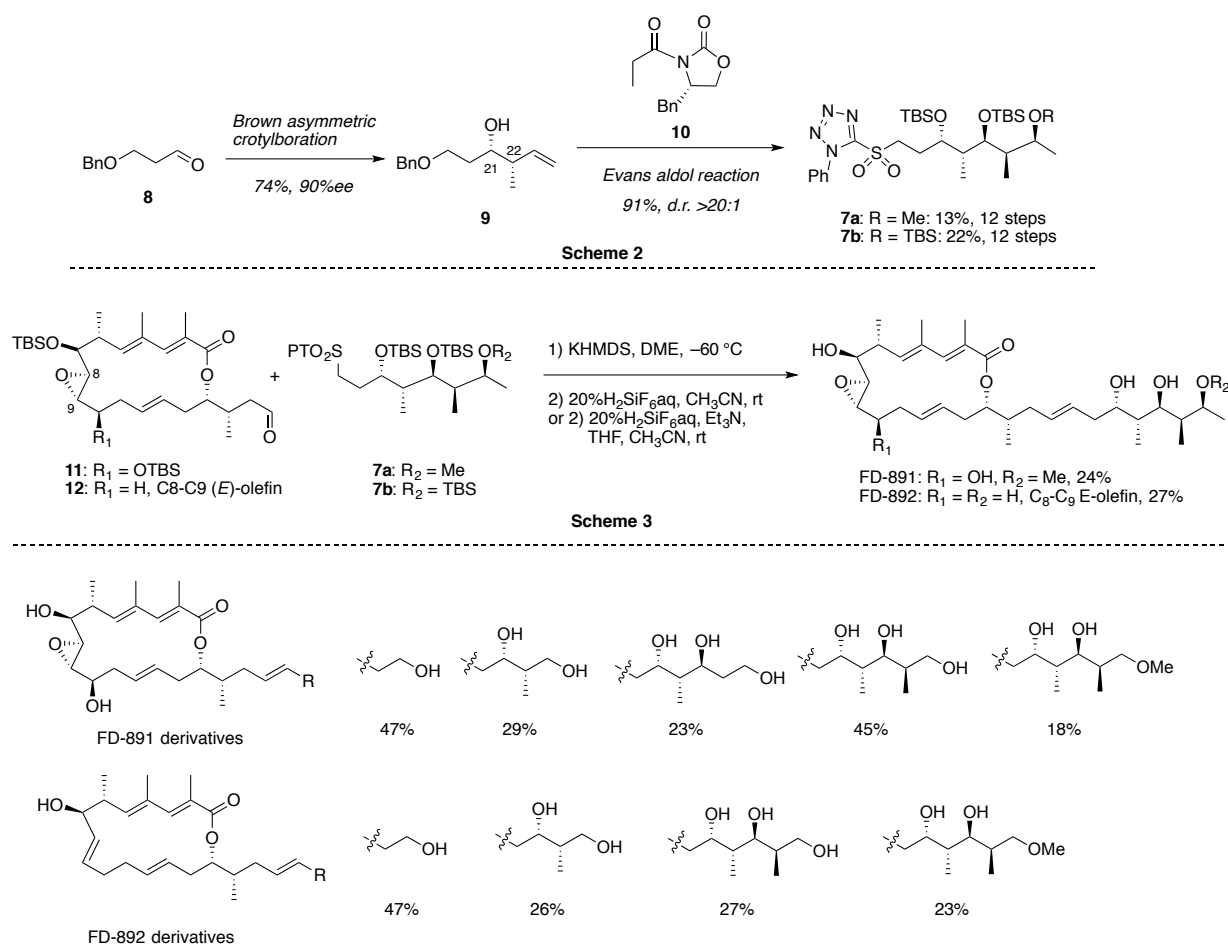


Figure 2

これらの合成化合物を用いた構造活性相関研究の結果、抗腫瘍活性発現には FD-891 (**1**) の全炭素鎖が重要であること、また C25 位 *O*-メチル基はその上で活性を増強していることがわかった。一方、一連の研究の中で C10 位水酸基の有無は抗腫瘍活性発現にはほぼ影響しないこともわかった。これらの結果は FD-891 (**1**) の作用機序解明のためのプローブ合成を行う際に重要な知見である。更に、FD-892 (**2**) の側鎖の炭素数も GfsF による C8-10 位の酸化、特に C10 位水酸基の導入に重要であることがわかった。

## 2. 新規 P450 基質スクリーニング法を用いた P450BM3 変異体の基質特異性解析

P450GfsF による FD-892 の基質認識機構の解析研究は、興味深い機能を有する特定の P450 酵素の機能をフォーカスライブラリーを用いて詳細に解析する手法である。この手法に対して、広範な構造多様性を有する小分子ライブラリーを用いて P450 の機能や基質特異性を網羅的に解析する手法が開発できれば、新規酸化触媒としての P450 の適応範囲が広がるのではないかと考えた。しかしこれまでに報告されている P450 基質スクリーニング法は、一度に解析可能な基質候補小分子の数に限界があるため、新規 P450 の基質や基質特異性の解析は現代の P450 研究のボトルネックとなっている。現在、P450 には 35,000 種以上の分子種の存在が示唆され、機能や生理基質が不明な P450 が多数存在しており、これらの解明は P450 研究の大きな課題である。この課題に対し、著者らは以前、P450 による小分子の酸化時に  $\text{NAD(P)}^+$  が生成することに着目し、これを利用することで化合物ライブラリーから特定の P450 の基質をハイスループットに判別する方法 (以下、2-ABF 法) を報告していたが<sup>[3]</sup>、今回、 $\text{H}_2\text{O}_2$  検出プローブ<sup>[4]</sup>を利用した 2 次スクリーニングや基質誘導スペクトル変化解析および LC/MS 解析を組み合わせることで、偽陽性化合物を排除し、P450 の基質特異性を決定するスクリーニング系を確立した。

次に著者は今回確立した基質スクリーニング系を P450 のアミノ酸変異に伴う基質特異性変化解析に適用した。アミノ酸変異がもたらす基質特異性の変化を網羅的に解析できれば、どの位置にどのようなアミノ酸を導入することで P450 の基質特異性がどう変化するかかの予測や、更には P450 の基質特異性のデザインにつながる可能性がある。P450BM3 変異体としてはドイツ Max Planck 石炭研究所の M. T. Reetz らが開発した、F87A, F87A/A330W を選択した。P450BM3 は直鎖脂肪酸を水酸化する酵素であるが、これらの変異体は 2 つのアミノ酸の変異のみで非天然基質であるテストステロンやプロゲステロンの立体選択的酸化能を獲得した極めて興味深い例である。合成制御化学分野所蔵の合成化合物ライブラリーに対して P450BM3 およびその変異体に今回のスクリーニング系を適用し、最終的に基質だと判断した化合物の構造とアミノ酸変異の対応を **Figure. 3** に示す。

この結果より、酵素の基質特異性はたった 1 つのアミノ酸で劇的に変化することが判明した。また、天然型 P450BM3 は長鎖脂肪酸を認識していたが、1 つ目のアミノ酸変異 (F87A) でそれらの長鎖脂肪酸は全く認識なくなり、環状化合物を認識するようになっていることがわかった。更に 2 つ目のアミノ酸変異 (A330W) で結合ポケットが狭くなっただけでなく、その基質特異性も狭まっていることも判明した。一連のアミノ酸変異による基質特異性の劇的な変遷は、著者のスクリーニング系をもって著者の知る限り、初めて示せたと言える。

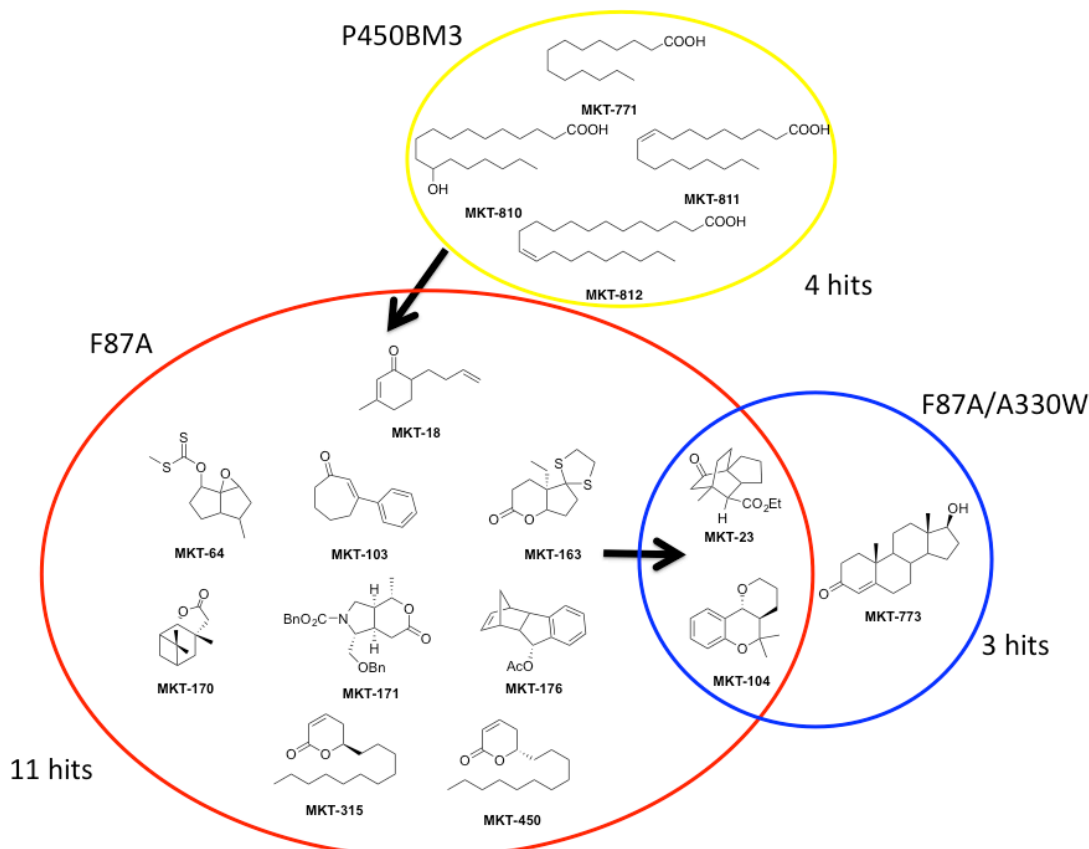


Figure 3 基質と判断された化合物の構造とアミノ酸変異の対応: 丸で囲まれた化合物がそれぞれの基質と選定したもの

以上、著者は合成化学的手法を用いて、興味深い活性と生合成経路を有する FD-891 (**1**), FD-892 (**2**) および構造活性相関研究に有用であり生合成では合成し得ない各種誘導体の合成を達成した。さらに FD-891 (**1**) と FD-892 (**2**) の構造活性相関研究を行い、生物活性および生合成酵素の認識における側鎖部の重要性を実証した。

また P450 の基質特異性を調べるためのボトルネックを解決するため、ケミカルバイオロジーの手法を用いて、当研究室で開発された基質の構造に依存しないスクリーニング法である 2-ABF 法を組み込んだ新規 P450 基質スクリーニング法を確立し、そのスクリーニング法で P450BM3 変異体の基質特異性を解明した。

Reference: [1] N. Kanoh, A. Kawamata, T. Itagaki, Y. Miyazaki, K. Yahata, E. Kwon, and Y. Iwabuchi, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5216-5219

[2] T. Itagaki, A. Kawamata, M. Takeuchi, K. Hamada, Y. Iwabuchi, T. Eguchi, F. Kudo, T. Usui and N. Kanoh, *J. Antibiot.* **2016**, *69*, 287-293

[3] T. Moriya, A. Kawamata, Y. Takahashi, Y. Iwabuchi and N. Kanoh, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11500-11502

[4] M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff and C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15392-15393

[5] S. Kille, F. E. Zilly, J. P. Acevedo and M. T. Reetz, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 738-743